

学校编码: 10384

分类号密级

学号: 24520111153381UDC



硕士学位论文

血清 miR-19b 和 miR-146a 作为非小细胞肺癌判断预后的生物标志物

Serum Levels of miR-19b and miR-146a as Prognostic

Biomarkers for Non-Small Cell Lung Cancer

吴朝辉

指导教师姓名: 姜杰教授

专业名称: 外科学

论文提交日期: 2014 年 4 月

论文答辩时间: 2014 年 5 月

学位授予日期: 2014 年月

答辩委员会主席:

评阅人:

2014 年 4 月

厦门大学博硕士论文摘要库

血清miR-19b和miR-146a作为非小细胞肺癌判断预后的生物标志物
吴朝辉
指导教师姜杰教授
厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年月日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

☐ 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

☐ 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年月日

摘要

目的分析探讨了 miRNAs 在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 患者预后中发挥的作用。**方法**利用 5 例 NSCLC 癌组织及癌旁组织 (其中 3 例为腺癌、2 例为鳞状上皮细胞癌), 采用能分析 365 个 miRNA 的 TaqMan 低密度芯片 (low density array) 含 365 个 miRNA) 确定 NSCLC 特异性的 miRNA 的表达谱。利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR), 通过对 61 对 NSCLC 癌组织及癌旁组织的方法进行检测, 对异常表达的 miRNAs 进一步给予验证, 分析其表达水平与 NSCLC 患者临床因素和预后的关系。同时, 我们对差异表达的 miRNAs 在 94 例健康志愿者和 94 例接受以铂类为基础的化疗的进展期的 NSCLC 患者的血清样本中进行进一步的分析, 分析其表达水平与 NSCLC 患者临床因素、治疗反应和预后的关系。**结果**3 种 miRNAs (miR-19b、miR-146a 和 miR-223) 在 NSCLC 癌组织中表达水平显著异常 ($P<0.05$)。在肿瘤组织中, miR-19b 高表达及 miR-146a 低表达的 NSCLC 患者分别与较高的 TNM 分期和淋巴结转移 (lymph node metastasis, LNM) 和较差的生存期显著相关 ($P<0.05$)。与对照组相比, 非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者血清中 miR-19b 水平显著升高 ($P<0.001$), 而 miR-146a 的表达水平则显著降低 ($P<0.001$)。同时, 血清 miR-19b 和 miR-146a 的水平与 NSCLC 患者的总生存期显著相关 ($P<0.05$)。尽管单独的血清 miR-19b 和 miR-146a 表达水平与晚期 NSCLC 患者的治疗反应不存在显著的相关性 ($P<0.05$), 但血清 miR-19b 低表达和 miR-146a 高表达的晚期 NSCLC 患者对化疗反应率更高, 能获得更长的生存时间 ($P<0.05$)。**结论**在预测 NSCLC 患者的化疗反应及生存期方面, miR-19b 和 miR-146a 是潜在的生物标记物。

关键词: 化学治疗肺癌微小核糖核酸 miR-19b miR-146a

Abstract

Objective Explored the role of miRNAs in the prognosis of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** The miRNA expression profiles were determined in 5 pairs of NSCLC and paracancerous tissues (3 adenocarcinomas and 2 squamous cell carcinomas) using TaqMan low density array, containing 365 miRNAs. Aberrantly expressed miRNAs were validated by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) in 61 pairs of NSCLC and paracancerous tissues. Differentially expressed miRNAs were further analyzed in sera from 94 healthy subjects and 94 advanced NSCLC patients receiving platinum-based chemotherapy. **Results** Three miRNAs (miR-19b, miR-146a, and miR-223) were significantly dysregulated in NSCLC tissues ($P < 0.05$). High miR-19b and low miR-146a expression in NSCLC tissues were associated with higher TNM stage, lymph node metastasis and poorer survival ($P < 0.05$). The serum levels of miR-19b in NSCLC patients were significantly higher ($P < 0.001$), whereas serum levels of miR-146a were significantly lower ($P < 0.001$), compared with those in controls. Serum levels of miR-19b and miR-146a were associated with overall survival of advanced NSCLC patients ($P < 0.05$). Although single serum miRNA showed no association with overall response rate ($P > 0.05$), advanced NSCLC patients with low serum level of miR-19b and high serum level of miR-146a achieved a higher overall response rate and longer survival time ($P < 0.05$). **Conclusion** These data suggest that miR-19b and miR-146a are potential biomarkers for the prediction of survival and response to chemotherapy in NSCLC.

Key words: chemotherapy; lung cancer; microRNA; miR-19b; miR-146a.

英文缩略词表

英文缩写	英文名称	中文名称
qRT-PCR	quantitative real-time PCR	实时荧光定量 PCR
NSCLC	non-small cell lung cancer	非小细胞肺癌
LN	lymphnode metastasis	淋巴结转移
RISC	RNA-induced silencing complex	RNA 诱导沉默复合物
NPM1	nucleo-phosmin1	核磷蛋白 1
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand	肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体
EGFR	epidermal growth factor receptor	表皮生长因子受体
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	核因子- κ B

目录

中文摘要	I
英文摘要	II
英文缩略词表	III
目录	IV
第 1 章 引言	1
1.1 miRNA 与肿瘤的相关研究	2
1.1.1 miRNAs 的形成及其作用机制	2
1.1.2 血清中的 miRNAs	5
1.1.3 miRNA 表达与多种不同肿瘤的发生	6
1.1.4 miRNA 与肺癌	7
1.1.5 miRNA 与肺癌耐药	7
1.1.6 简便的 miRNA 获取途径：循环 miRNA	9
1.2 本课题研究的目标、内容与意义	9
第 2 章实验材料与方法	11
2.1 实验材料	11
2.1.1 组织学标本及血清标本	11
2.1.2 主要化学试剂和耗材	12
2.1.3 仪器	13
2.2 实验方法	14
2.2.1 RNA 分离提取	14
2.2.2 miRNA 表达谱	15
2.2.3 实时荧光定量 PCR	16
2.2.4 统计学分析	16
第 3 章结果与讨论	17
3.1 结果	17
3.1.1 miRNA 表达谱	17

3.1.2 61 例 NSCLC 患者 miR-19b、miR-146a 和 miR-223 组织表达水平	18
3.1.3 61 例非小细胞肺癌（NSCLC）患者的临床结果与 miR-19b, miR-146a 表达的相关性	20
3.1.4 94 例晚期非小细胞肺癌（NSCLC）患者血清中 miR-19b, miR-146a 和 miR-223 的水平	25
3.1.5 血清 miR-19b、miR-146a 和 miR-223 表达水平与 94 例晚期非小细胞肺癌（NSCLC）患者的临床因素和治疗结果的相关性	25
3.2 讨论	31
3.2.1 在非小细胞肺癌（NSCLC）患者中，miR-19b 和 miR-146a 在癌组织和血清中异常表达水平一致	32
3.2.2 miR-19b 和 miR-146a 的表达水平与非小细胞肺癌（NSCLC）患者的临床特征相关	33
3.2.3 miR-19b 和 miR-146a 的表达水平与非小细胞肺癌（NSCLC）患者的临床结果相关。	33
结论	35
参考文献	36
致谢	43

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Abbreviation	III
Contents	IV
Chapter I Preface	1
1.1 miRNA and tumor research	2
1.1.1 The production of miRNAs and mechanism of its action	2
1.1.2 miRNAs in serum	5
1.1.3 miRNAs expression and tumorigenesis of various types of cancer	6
1.1.4 miRNA and Lung cancer	7
1.1.5 miRNA and resistance of Lung cancer	7
1.1.6 A non-invasive access for miRNAs: circulating miRNAs	9
1.2 Aims, contents and significance of the projects	9
Chapter II Materials and methods	11
2.1 Materials	11
2.1.1 Histological and serological specimens	11
2.1.2 Chemical reagents	12
2.1.3 Equipments	13
2.2 Methods	14
2.2.1 Extraction and separation of RNA	14
2.2.2 The miRNA expression profiles	15
2.2.3 qRT-PCR	16
2.2.4 Statistical analysis	16
Chapter III Results and discussion	17
3.1 Results	17
3.1.1 The miRNA expression profiles	17
3.1.2 The tissue levels of miR-19b, miR-223 and miR-146a in 61 NSCLC patients	18

3.1.3 The association of miR-19b and miR-146a with clinical outcome of 61 NSCLC patients	20
3.1.4 The serum levels of miR-19b, miR-223 and miR-146a in 94 advanced NSCLC patients	25
3.1.5 The association of serum miR-19b, miR-223 and miR-146a with clinical outcome of 94 advanced NSCLC patients	25
3.2 Discussion	31
3.2.1 Both miR-19b and miR-146a were aberrantly expressed in tissues and sera from NSCLC patients and presented the same trend.	32
3.2.2 Relationship between miR-19b, and miR-146a and clinicopathological characteristics in NSCLC patients	33
3.2.3 Relationship between miR-19b, and miR-146a and clinical outcome in NSCLC patients	33
Conclusions	35
References	36
Acknowledgements	43

第1章引言

肺癌（Lung cancer）大多数是起源于支气管粘膜上皮，因此也称为支气管肺癌（bronchopulmonary carcinoma），它是一种常见的呼吸系统恶性肿瘤，它严重威胁着人类的健康。近 50 年来，全世界肺癌的发病率明显增高。据统计，在欧美某些国家和我国大城市中，肺癌的发病率和死亡率已居男性各种肿瘤的首位。肺癌病人多数是男性，男女之比约为 3-5:1⁽¹⁾。随着我国社会的发展，工业化和城市化的程度的升高，近年来，女性肺癌的发病率也明显增高，大多数女性患者大于 40 岁。

肺癌的发生是环境因素与宿主因素相互作用的结果，但确切的发病尚不清楚。肺癌的形成和其他肿瘤的发生相似，也是多因素作用、多基因变化和多阶段发展的过程。吸烟是目前已被公认的肺癌最重要的危险因素，并且与吸烟量、开始吸烟年龄以及吸烟的年限密切相关，吸烟量越大，开始吸烟年龄越早，吸烟的年限越长，那么患肺癌的危险性就越高。还包括其他的一些危险因素，比如空气污染（主要有环境烟草烟雾、煤烟、烹调时产生的食用油油烟等），职业暴露（例如石棉、甲醛、印刷工人等）。除了外在的环境因素外，内在因素即患者的遗传易感性起到重要的作用。在肺癌发展的不同阶段均有原癌基因的激活和抑癌基因的失活。比较常见的是 p53 抑癌基因和 ras 癌基因的突变⁽²⁾。

肺癌从病理学上大体可以分成两大型：小细胞肺癌（SCLC）和非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC），在这临床上以后者常见，80%以上的患者都是非小细胞肺癌（NSCLC）。目前，肺癌的临床治疗策略是以手术治疗为主，辅以化疗、放疗、靶向治疗等的综合治疗。由于肺癌发病的隐蔽性，大部分患者在疾病早期并没有明显的症状，这部分患者均需要通过定期的肺部体检才能发现。因此，绝大多数到医院就诊的肺癌患者都是中晚期的患者，虽然术前的新辅助放化疗能够大大提高手术切除率，尤其是对于临床分期在 IIIa 以上的患者，能够在一定程度上改善肺癌患者的治疗效果，但是效果并不明显。因此，提高肺癌患者的治疗效果有赖于早期发现、早期诊断、早期治疗。对于晚期肺癌的患者来说，如何提高治疗效果以及改善患者的生存治疗，并不能通过手术这种治疗手

段来解决。近年来,随着对肺癌研究的深入,出现了数个靶向治疗药物,大大地提高患者的治疗依从性、耐受性,也很大程度上提高了肺癌的治疗效果、改善晚期肺癌患者的生存质量。虽然如此,但是肺癌总的预后依然很差,因此急需一种简便的工具或是指标,能够了解肺癌对药物治疗的敏感性或能够协助判断预后。以便能够从晚期肺癌患者的人群中筛选出可能治疗敏感、预后较好的患者,以期能够更为针对性的治疗和节省医疗资源,避免过度治疗和不必要的治疗,增加晚期肺癌患者的治疗费用、降低患者的生存质量。这对肺癌的个体化治疗和提高肺癌的治疗效果将是有决定性意义的。

肺癌是全世界癌症死亡的主要原因之一^[3]。近年来,虽然在肺癌的诊断和治疗方面具有很大的发展,包括肺癌患者的早期发现、早期诊断、早期治疗,提高了手术根治性切除率;术前新辅助化疗、放射治疗甚至术前靶向治疗的应用,明显的提高手术切除率,肺癌的生存率已经有很大的提高,但是预后仍然很差。手术后肿瘤的高复发率以及肿瘤对化学治疗药物的耐药性是最主要的两个原因。到目前为止,有关肺癌在蛋白及基因水平的分子网络已经得到部分阐明^[4]。然而,在过去 10 年的时间里,虽然基于基因检测的肺癌个性化治疗已经得到相当程度的发展,但是肺癌患者的 5 年死亡率并没有得到明显的改善。

1.1 miRNA 与肿瘤的相关研究

1.1.1 miRNAs 的形成及其作用机制

MicroRNAs (miRNAs) 是真核生物中一类非编码的小分子单链 RNA, 长约 22-24 个核苷酸。miRNA 的形成、加工、成熟可分为两个阶段^[5-6]。第一阶段在细胞核中生成初级产物 (pri-miRNA), 并被 RNaseIII 家族中的 Drosha 剪切为长约 70-80bps 的“发卡状”的前体 (pre-miRNA)。其次转移到细胞浆中由 Dicer 酶将 (pre-miRNA) 加工成为长约 22bps 的双链 RNA。其中一条链作为成熟的 miRNA 参与到基因表达的调控, 另一条链则被降解掉 (图 1-1)。miRNA 在人体中大量存在, 其作用机制主要是: 能够负性调节 mRNA 的降解, 然后通过结合到 3-端的 mRNA 非翻译区形成 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC), miRISC 发挥调节基因表达的机制主要则是根据 miRNA 与同源 mRNA 碱基互补配对的情况而决定的, 对于能够完全配对的 2 个 RNA 序列,

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库